

43. Petros A., Bennett D., Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock // *Lancet* - 1991. - V. 338. - P. 1557-1558.
44. Soloviev A.I., Parshikov A.V., Stefanov A.V. Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats // *Vasc. Res.* - 1998. - V. 35. - P. 325-331.
45. Star R.A. Nitric oxide: Southwestern Internal Medicine Conference // *Am. J. Med. Soc.* - 1993. - V. 306. - P. 348-355.
46. Taddei S., Salveni A., Vindis A., Mattei P., Arzilli F. Endothelium-dependent forearm vasodilation is reduced in normotensive subjects with familial history of hypertension // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 1992. - V. 20 (Suppl 12). - P. S193-S195.
47. Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction in hypertension // *J. Hypertens.* - 1996. - V. 14 (Suppl. 5). - P. S83-S93.
48. Wort S.J., Evans T.W. The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions // *Br. Med. Bull.* - 1999. - V. 55. - P. 30-40.
49. Xue C., Rengasamy A., Lecras T.D., Koberna P.A., Dailey G.C., Johns R.A. Distribution of NOS in normoxic vs hypoxic rat lung: Upregulation of NOS by chronic hypoxia // *Am. J. Physiol.* - 1994. - V. 11. - P. L667-L678.
50. Young I.S., Torney J.J., Trimble E. R. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat // *Free Radical. Biol. Med.* - 1992. - V.13. - P.41-46.

## ОКСИД АЗОТА И ЭНДОТЕЛИН-1,2 УЧАСТВУЮТ В РЕАЛИЗАЦИИ КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ ГЕМИЧЕСКОЙ ФОРМЕ ГИПОКСИИ

Реутов В.П.<sup>1</sup>, Сорокина Е.Г.<sup>2</sup>, Пинелис В.Г.<sup>2</sup>, Коршунова Т.С.<sup>4</sup>, Родионов А.А.<sup>1</sup>,  
Шекшеев Э.М.<sup>3</sup>, Косицын Н.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,

<sup>2</sup>Институт педиатрии РАМН, <sup>3</sup>Институт биохимической физики РАН,

<sup>4</sup>Институт неврологии РАМН, Москва

Нитраты, нитриты и окислы азота являются наиболее широко распространенными соединениями среды обитания современного человека [1]. Эти вещества синтезируются эндогенно из L-аргинина [2-7,9,11,14], а также широко используются в медицине [8,17-21]. Обладая способностью снижать внутриклеточную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в гладкомышечных клетках, NO вызывает вазодилатацию [6,11,17]. Вместе с тем, известны и такие данные, когда вместо вазодилатации авторы некоторых

исследований наблюдают вазоконстрикцию в ответ на применение NO-генерирующих соединений [11,17]. Противоположным (вазоконстрикторным) действием обладает вазоактивный пептид – эндотелин-1,2 (эндотелин) [15,16,22]. Высказывается предположение, что эндотелин играет важную роль в регуляции регионального кровотока в гипоксических условиях. Наибольшая плотность клеток, содержащих мРНК эндотелина, локализуется в гипоталамусе, что свидетельствует о регуляторном значении эндотелина в мозговой ткани [22,23]. Известно, что эндотелин стимулирует высвобождение некоторых гормонов, эйкозаноидов, эндотелийзависимого фактора расслабления сосудов [20,22,23]. Таким образом, NO и эндотелин являются активными вазорегуляторами [9, 10, 22, 23] и нарушение их баланса в крови может играть важную роль как в патогенезе сосудистых расстройств, приводящих к нарушению кровообращения, так и в реализации компенсаторно-приспособительных реакций при различных гипоксических состояниях. Целью настоящего исследования явилось исследование роли оксида азота и эндотелина в реализации компенсаторно-приспособительных механизмов при гемической форме гипоксии.

#### ***Материалы и методы исследований***

Работа выполнена на крысах-самцах весом 180-200 г (71 беспородная крыса и 12 крыс Wistar). Раствор  $\text{NaNO}_2$  вводили внутривенно в объеме 0,5 мл в дозе 5 мг/100 г массы тела. Кровь брали через 1 ч после введения этого вещества, когда уровень метНб для данной дозы нитрита достигал максимального значения. Содержание белка в сыворотке крови определяли по методу Лоури, альбумина – колориметрическим методом с бромкрезоловым зеленым, гемоглобина и метНб – унифицированными методами, суммарного  $\alpha$ -аминоазота – по методу Рубинштейна и Прайса [см.15,16]. Белки и пептиды сыворотки крови разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором при  $\lambda = 280$  нм на приборе фирмы “Waters” (США). Кровь для определения содержания эндотелина и сGMP брали из яремной вены, а для определения содержания гемоглобина, метгемоглобина, общего белка, альбумина и хроматографического разделения белков – из хвостовой вены. Образцы крови собирали в пробирки, содержащие 7,5 мМ ЭДТА. Для получения плазмы кровь центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g ( $t=4^\circ\text{C}$ ) и хранили до начала анализа при  $-20^\circ\text{C}$ ). Экстракцию и очистку эндотелина из подкисленной 0,25 мл 2М HCl плазмы осуществляли последовательным элюированием 5 мл 0,1 % трифторуксусной кислоты (ТФК) и 2 мл 80% метанола с 0,1% ТФК на колонках Amprep 500 mg C2 (“Amersham”). Последнюю фракцию, содержащую эндотелин, высушивали в атмосфере азота и использовали для определения содержания эндотелина с помощью радиоиммунологических наборов фирмы “Amersham”. Для определения

содержания сGMP в плазме крови применяли этанольную экстракцию с последующим высушиванием под струей азота и спектрофотометрическим определением при  $\lambda = 492$  нм с помощью иммуноферментных наборов фирмы "Экрос". Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) крови измеряли на ЭПР-спектрометре отражательного типа с двойной модуляцией магнитного поля [17].

### ***Результаты и их обсуждение***

Показано, что поступление нитритов в дозе 5 мг/100 г массы тела вызывает через 1 ч максимальное для данной дозы нитритов накопление метHb ( $68,7\% \pm 1,3$ ,  $p < 0,001$ ). Следовательно, и гипоксия в это время достигает своего максимального значения. Содержание общего белка в сыворотке крови через 1 ч после введения нитрита натрия достоверно снижалось на 33 % ( $p < 0,001$ ), альбумина – на 50%, а гемоглобина – на 22% ( $p < 0,001$ ). В дальнейшем было установлено, что такое снижение содержания белка как в сыворотке крови, так и внутри эритроцитов связано прежде всего с переходом белка из растворимого в мембранно-связанное состояние. Анализ данных литературы и своих собственных результатов позволил предположить, что такой переход белков из цитоплазмы в примембранную область может как защищать мембраны от повреждающего действия оксида азота, так и активировать многие ферменты, которые обладают более высокой активностью в мембранно-связанной форме [17]. Одновременно с уменьшением содержания белков в сыворотке крови наблюдали повышение на 57% уровня  $\alpha$ -аминоазота ( $p < 0,001$ ). Одной из причин наблюдаемых изменений могла явиться активация эндопептидаз и усиление деструктивных изменений белков под действием свободно радикальных соединений NO и NO<sub>2</sub>, образующихся при нитритной гипоксии. Разделение белков и пептидов методом ВЭЖХ подтвердило результаты исследований, полученных с использованием метода спектрофотометрии. Наиболее заметное снижение содержания белков было отмечено для фракции с молекулярной массой 60-70 кДа (альбумин). Напротив содержание пептидов с молекулярной массой 2,0-4,0 кДа повышалось. При этом максимум увеличения содержания отмечали для фракции с молекулярной массой 2,5 кДа. В состав этой фракции может входить достаточно большое количество физиологически активных пептидов, содержание которых может изменяться в ходе реализации компенсаторно-приспособительных изменений при гемической форме гипоксии. Одним из пептидов, молекулярная масса которого равна 2,492 кДа, является эндотелин. Этот пептид, как указывалось выше обладает вазоконстрикторным действием и высвобождается при гипоксии и усилении синтеза NO в организме млекопитающих [16,17]. Поэтому можно было предполагать, что содержание эндотелина в крови при гемической гипоксии будет изменяться.

Определение содержания эндотелина в плазме крови крыс спустя 1 ч после введения  $\text{NaNO}_2$  в дозе 5 мг/100 г массы тела выявило повышение концентрации этого пептида более чем в два раза по сравнению с контрольными животными (в опыте  $42,34 \pm 7,76$  пкмоль/л; в контроле –  $20,1 \pm 1,84$  пкмоль/л,  $p < 0,01$ ). В этот период регистрировали образование Hb-NO комплексов. Содержание этих комплексов составляло 10-15% от общего содержания Hb и было равно  $\sim 2 \times 10^{-4}$  М. Следовательно, при повышенном поступлении нитросоединений и гипоксии в организме идет интенсивное образование Hb-NO комплексов, что, в свою очередь, сопровождается увеличением синтеза эндотелина. Определение концентрации cGMP в плазме крови одновременно с содержанием эндотелина показало повышение этого нуклеотида в 3 раза после введения  $\text{NaNO}_2$  ( $42,8 \pm 12,9$  нмоль/л – в опыте и  $14,0 \pm 2,77$  нмоль/л – в контроле,  $p < 0,05$ ). Такое изменение содержания cGMP в плазме крови крыс могло явиться следствием активации NO растворимой гуанилатциклазы в клетках тканей. Полученные данные свидетельствуют о том, что гемическая гипоксия и изменение сосудистого тонуса по типу вазодилатации, отмеченные многими исследователями на фоне действия нитропрепаратов, сопровождаются активацией компенсаторных систем, одним из действующих элементов которых является эндотелин, обладающий вазоконстрикторным действием.

Известно, что при связывании с пептидэргическими рецепторами эндотелин активирует  $\text{Ca}^{2+}$ -мобилизующую систему, а вместе с ней и синтез NO, который при взаимодействии с растворимой гемсодержащей гуанилатциклазой увеличивает ее активность и повышает уровень cGMP [12]. Таким образом, повышение содержание веществ, обладающих вазоконстрикторным действием (эндотелина) приводит к усилению синтеза соединений, способных вызывать вазодилатацию (NO и cGMP), а усиление образования оксида азота при гемической гипоксии активирует синтез эндотелина. Поэтому нередко после вазодилатации может наступить вазоконстрикция и, наоборот, вазоконстрикция может смениться вазодилатацией [16,17]. Такое сопряжение регуляторных систем, по-видимому, необходимо для обеспечения организма эффективной регуляцией с участием механизмов отрицательной обратной связи.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. // Физиология человека. 1990. Т.19. №3. С.131-149.
2. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П., Никишкин Е.И. // Изв. АН СССР, сер. биол. 1983. №2. С.240-250.
3. Башкатова В.Г., Раевский К.С. // Биохимия. 1998. Т.63, №.7, С.1020 - 1028.

4. Ванин А.Ф. // Биохимия. 1998. Т.63, №7.С.924-938.
5. Викторов И.В.// Вестник РАМН. 2000. №4. С.5-10.
6. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Реутов В.П. // Вестник РАМН. 2000. №4. С.30-34.
7. Зинчук В.В., Борисюк М.В. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. -1999. - Т.127, №6. -С.616-619.
8. Козлов И.А., Попцов В.Н. // Анестезиология и реаниматология. 1997.№5. С.80- 87.
9. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Архипенко Ю.В. // Вестник РАМН. 2000. №4. -С.16-21.
10. Мойбенко А.А., Коцюруба А.В., Марченко Г.И. и др. // В кн.: Роль монооксида азота в процессах жизнедеятельности. Под ред. В.Н. Гурина, В.А. Кульчицкого, А.Г. Чумака. Минск: Полибиг.1998. С.133-135.
11. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. // Биохимия.2000. №4. С.
- 12.Пинелис В.Г., Сорокина Е.Г., Реутов В.П. и др. // Докл. РАН. 1997. Т.352.№2. С.259-261.
13. Раевский К.С. // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. 1997. №5. С.484-490.
14. Раевский К.С., Башкатова В.Г., Ванин А.Ф. // Вестник РАМН. - 2000. -№4. -С.11-15.
15. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Пинелис В.Г. и др.//Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1993, №11, С.506-508.
16. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Пинелис В.Г. и др.//Вопр. мед. химии.1994, Т.40,№6, С.27-30.
17. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М:Наука, 1997, 156 с.
18. Сагач В.Ф., Шиманская Т.В., Надточий С.Н. // Фізіол. Журн., 2000,Т.46, №2, С.33-40.
19. Шаповал Л.Н., Сагач В.Ф., Побегайло А.В. и др. // Нейрофизиология. 1996, Т.28, С.111-120.
- 20.Шебеко В.И. Эндотелий и система комплемента. Витебск:Витебский госмедуниверситет. 1999. 149.
- 21.Шебеко В.И., Родионов Ю.Я. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1993, №11, С.479-480.
22. Lee M.E., dela-Monte S.M., Ng S.C., Bloch K.D.//J. Clin. Invest. 1990, Vol.86, №1, P.141-147.
23. Kourembanas S., Marsen P.A., McQuillan L.-P. Faller D.V. // J. Clin. Invest. 1991, Vol.88, №3, P.1054-1057.